



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|---|------------------|--|
| <p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 31/715</p> | <p>A1</p> | <p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/47518</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)</p> |
| <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02284</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 17. April 1998 (17.04.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 16 120.0 17. April 1997 (17.04.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EU- ROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULAR- BIOLOGIE (EMBL) [DE/DE]; Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SIMONS, Kai [FI/DE]; Kleinschmidtstrasse 27, D-69115 Heidelberg (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</p> | | <p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> |
| <p>(54) Title: USE OF CHOLESTEROL-LOWERING AGENTS TO INFLUENCE SIGNAL TRANSDUCTION PROCESSES IN THE CELL MEMBRANE AND IN THE PROPHYLAXIS OR TREATMENT OF PRION-ASSOCIATED DISEASES OR ALZHEIMER'S DISEASE</p> <p>(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON CHOLESTERINSENKENDEN MITTELN ZUR BEEINFLUSSUNG VON SIGNALTRANS- DUKTIONSVORGÄNGEN AN DER ZELLMEMBRAN, IN DIE PROPHYLAXE ODER BEHANDLUNG VON PRION-ASSORZIERTE- ODER ALZHEIMERISCHE KRANKHEIT</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to the use of cholesterol-lowering agents in the prophylaxis or treatment of diseases based on conformational change of prions and Alzheimer's disease as well as for influencing signal transduction processes in the cell membrane.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Zur Prophylaxe oder Behandlung von Krankheiten, die auf einer Konformationsänderung von Prionen beruhen, und von Alzheimer'scher Krankheit werden im Rahmen der Erfindung cholesterinsenkende Mittel ebenso eingesetzt wie zur Beeinflussung von Signaltransduktionsvorgängen an der Zellmembran.</p> | | |

APPLICATION NO. 10/071,633 FILED 02-08-02
DOCKET NO. 5730-C1-01-FJT

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------|----|-----------------------------|----|------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshjan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | | Republik Mazedonien | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | ML | Mali | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MN | Mongolei | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MR | Mauretanien | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MW | Malawi | US | Vereinigte Staaten von |
| CA | Kanada | IT | Italien | MX | Mexiko | | Amerika |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CM | Kamerun | | Korea | PL | Polen | | |
| CN | China | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CU | Kuba | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CZ | Tschechische Republik | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| DE | Deutschland | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DK | Dänemark | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| EE | Estland | LR | Liberia | SG | Singapur | | |

VERWENDUNG VON CHOLESTERINSENKENDEN MITTELN ZUR BEEINFLUSSUNG VON SIGNALTRANSDUKTIONSVORGÄNGEN AN DER ZELLMEMBRAN, IN DIE PROPHYLAXE ODER BEHANDLUNG VON PRION-ASSOZIIERTE- ODER ALZHEIMERISCHE KRANKHEIT

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von cholesterinsenkenden Mitteln zur Prophylaxe oder Behandlung von Erkrankungen, die mit einer Konformationsänderung von Prionen einhergehen, oder von Alzheimer'scher Krankheit.

Für die meisten Molekularbiologen, die sich mit Membranproteinen beschäftigen, liegt die Funktion von Lipiden hauptsächlich in ihrer Eigenschaft, als Solvens für Proteine zu dienen (Singer & Nicolson, Science 175 (1972), 720-731). Dies ist jedoch sicher nicht ihre einzige Rolle. Die verschiedenen Lipidarten sind nicht nur in einer fluiden Doppelschicht angeordnet, sondern sie sind auch über die exoplasmatischen und cytoplasmatischen Membranbereiche asymmetrisch verteilt (Bretscher und Raff, Nature 258 (1975), 43-49; Roelofsen & Op den Kamp, Plasma Membrane Phospholipid Asymmetry and its Maintenance: The Human Erythrocyte as a Model 1-7-46 (1994)). Außerdem hat man festgestellt, dass die Lipide auch in bestimmter Weise organisiert sind und damit mehr Regulierungsaufgaben erfüllen als bisher bekannt (Glaser, Curr. Op. Struct. Biol. 3 (1993), 475-481, Thomas et al., J. Cell Biol. 125 (1994), 195-802, Kusumi & Sako, Curr. Opin. Cell Bio. 8 (1996), 566-574). Es hat sich nun gezeigt, dass eine laterale Organisation von Lipiden entsteht durch Verbindung von Sphingolipiden und Cholesterin zu sich bewegenden Schollen oder Flößen, an welche sich Proteine innerhalb der Doppelschicht spezifisch anlagern können. Die Existenz solcher Sphingolipid-Cholesterin-Flöße führt zu einer grundsätzlich anderen Beurteilung der Membranorganisation und erlaubt neue Einblicke in die Funktion von Zellmembranen.

Auf Basis von Untersuchungen zu solchen Sphingolipid-Cholesterin-Flößen sind die in Figur 1B gezeigten Modelle entstanden. Man geht davon aus, dass die Sphingolipidkopfgruppen, welche größere Bereiche der Ebene des exoplasmatischen Teils der Membran belegen als die Kohlenwasserstoffketten der

- 2 -

Lipide in der Membranschicht, Zwischenräume entstehen lassen, die durch Cholesterinmoleküle gefüllt werden, die sozusagen als Abstandhalter fungieren (Figur 1B). Eine dichte Aneinanderfügung dieser Sphingolipid-Cholesterinklaster auf dem exoplasmatischen Teil der Membran lässt sie als Gesamtanordnung innerhalb der Membrandoppelschicht fungieren. Es ist dabei wichtig, festzustellen, dass die Sphingolipide normalerweise eine lange Fettsäure (C_{20} - C_{26}) aufweisen, die über eine Amidbindung an die Sphingosinbasis angeheftet ist, wobei aufgrund der Länge der Fettsäure diese mit dem cytoplasmatischen Teil der Doppelschicht der Membran in Verbindung treten kann. Da Cholesterin in beiden Membranschichten vorhanden ist, ist es auch möglich, dass das Molekül als Spacer im cytoplasmatischen Teil der Membran fungiert und dabei Zwischenräume ausfüllt zwischen dort vorhandenen Fettsäuren (Figur 1B). Die neuen Erkenntnisse über die Organisation von Sphingolipiden und Cholesterin in der Zellmembran führten nun zu der Erkenntnis, dass hierin auch eine Grundlage liegen könnte für die Behandlung oder Verhinderung von Krankheiten, welche mit einer Konformationsänderung von Prionproteinen einhergehen, oder aber der Alzheimer'schen Krankheit. Derartige Krankheiten sind bisher noch nicht behandelbar, meist ist auch ihre Erkennung sehr schwierig, eine letztendliche Sicherheit kann meist nur durch Autopsie nach dem Tode des Patienten erhalten werden. Insofern besteht ein dringendes Bedürfnis an einer Möglichkeit, derartige Krankheiten, zumindest im Verdachtsfall, zu behandeln oder ihre Entstehung zu verhindern.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, eine Möglichkeit bereitzustellen, auf Krankheiten wie die Alzheimer'sche Krankheit oder andere Krankheiten, bei welchen eine Veränderung von Proteinen an Sphingolipid-Cholesterin-Flößen stattfindet, positiv einwirken zu können.

Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch die Verwendung von cholesterinsenkenden Mitteln zur Prophylaxe oder Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Konformationsänderung von Prionen beruhen, oder von Alzheimer'scher Krankheit. Als cholesterinsenkende Mittel können alle Mittel

- 3 -

verwendet werden, welche den Cholesteringehalt im Blut senken und zu diesem Zweck zur Prophylaxe anderer Erkrankungen, vor allem der Arteriosklerose und des Herzinfarkts eingesetzt werden oder werden können. Beispiele von cholesterinsenkenden Mitteln umfassen den Wirkstoff Lovastatin (Mevinacor, 5 Mevinolin, Monacolin-K, MK-803), sowie weitere Arzneimittel gegen Hypercholesterinämie, wie etwa Pravastatin-Natrium, Simvastatin, Bezafibrat, Clofibrat, Etofyllinclofibrat, Xenofibrat, Gemfibrozyl, Etofibrat, Colestipol-HCl, Colestyramin, Xantinolnicotinat, Icositolnicotinat, Probucol und dergleichen. Lovastatin hemmt die Cholesterinbiosynthese auf der Basis der Mevalonsäure. Es 10 wird bereits als Arzneimittel bei Hypercholesterinämie verwendet, wo es in Dosen von bis zu 20 mg/Tag verabreicht wird. Die erfindungsgemäßen Dosierungen von cholesterinsenkenden Mitteln sind bekannt oder können vom Fachmann leicht ermittelt werden.

15 Eine weitere mögliche Art und Weise zur Senkung des Cholesteringehalts ist, auf die Regulierung des Cholesterinmetabolismus Einfluß zu nehmen. Die Verteilung von Cholesterin auf Sphingolipid-Cholesterinflöße ist viel höher als dessen Verteilung auf Gebiete, in denen sich keine Flöße befinden. Im endoplasmatischen Retikulum, wo der zelluläre Cholesteringehalt wahrgenommen und reguliert wird, 20 gibt es praktisch keine Flöße. Sphingolipid-Cholesterinflöße fließen vom Golgi-Apparat nicht zum endoplasmatischen Retikulum zurück. Das Senken des Cholesteringehalts beeinflusst zunächst das nicht in Flößen enthaltene Cholesterin, was dazu führt, daß weniger Cholesterin in das endoplasmatische Retikulum zurückfließt. Indem beispielsweise der Sphingolipidgehalt reduziert 25 wird, wäre es dann möglich, gleichzeitig die Cholesterinsynthese in der Zelle zu senken, da mehr Cholesterin in das endoplasmatische Retikulum zurückfließen kann. Dies kann beispielsweise durch Sphingolipidsynthese-Inhibitoren geschehen.

30 Als Krankheiten, die auf einer Konformationsänderung von Prionproteinen beruhen, wird derzeit vor allem die beim Schaf auftretende Krankheit Scrapie angesehen. Auch für die BSE-Problematik könnte die vorliegende Erfindung von

- 4 -

Bedeutung sein, wenn sich erhärtet, dass der auslösende Faktor für die letztendlich zum Tode führende Krankheit ebenfalls die Konformationsänderung von Prionproteinen ist und diese Erkrankung der Rinder auf den Menschen übertragbar ist. Somit wäre auch die Behandlung der Creutzfeld-Jacob-Krankheit
5 ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Das Scrapie-Prionenprotein PrP^{Sc} ist die bisher einzige bekannte Komponente eines übertragbaren Prions. Es ist abgeleitet von einem normalerweise an Glycosylphosphatidylinositol (GPI) verankerten Protein PrP^{C} , das in Neuronen
10 exprimiert wird, wobei durch eine Konformationsänderung des PrP^{C} das Prionprotein PrP^{Sc} entsteht, welches proteaseresistent ist. Vermutlich findet diese Konformationsänderung an Sphingolipid-Cholesterin-Flößen statt. Die Konformationsänderung scheint abhängig zu sein von der GPI-Verankerung, da chimäre Proteine, die eine eigene Transmembrandomäne enthalten, nicht der
15 Konformationsänderung unterliegen. PrP^{C} ist unlöslich in Triton X-100 bei 4°C während der Konformationsänderung, und eine Verarmung an zellulärem Cholesterin verhindert die Bildung von PrP^{Sc} . Interessanterweise kann PrP^{C} durch clathrinbeschichtete Vesikel mittels Endocytose in die Zelle eingeschleust werden, vermutlich aufgrund von Bindung an ein bisher unbekanntes
20 Transmembranprotein mit einem sogenannten coated pit-Signal. Diese Bindung hält PrP^{C} möglicherweise von den Flößen entfernt, wo die bisher noch ungeklärte PrP^{C} - PrP^{Sc} -Transformation stattzufinden scheint.

Eines der wichtigen Merkmale der Pathogenese der Alzheimer'schen Krankheit
25 ist die fortschreitende zerebrale Anhäufung des Amyloid- β -Peptids ($A\beta$), einem proteolytischen Spaltprodukt aus einem Amyloidvorläuferprotein (APP). Neu synthetisiertes APP wird in den Neuronen in die Axone geleitet und dann durch Transzytose an die Dendriten weitergeführt. APP wird während des intrazellulären Transports einer Reihe von Spaltungen unterzogen, wobei entweder das amyloide
30 Fragment $A\beta$ oder eine nicht amyloide, sekretierte Form APP_{sec} (secreted) freigesetzt wird. Bei der Spaltung zu APP_{sec} durch α -Sekretase (α -Spaltung) verbleibt ein Transmembranfragment von 8 kDa in der Zellmembran. Die Spaltung

- 5 -

von APP zu A β geschieht in zwei Schritten. Zunächst wird durch die sog. β -Spaltung ein Fragment von 10 kDa von APP erzeugt, welches dann innerhalb der Transmembrandomäne noch einmal gespalten wird (γ -Spaltung), wobei A β entsteht. Wie PrP^c ist auch ein Teil des APP in Neuronen in Triton X-100 unlöslich, eine Eigenschaft, die auch GPI-verankerte und Transmembranproteine aufweisen, welche an Sphingolipid-Flöße binden. Wo genau die A β -Produktion stattfindet, ist nicht klar, jedoch weisen kürzlich erhaltene Resultate darauf hin, dass A β komplexiert an ein Lipid in Sphingolipid-Cholesterin-Flößen, das GM1-Gangliosid, vorgefunden wird in den frühesten Krankheitsmanifestationen im Gehirn. Interessanterweise wird ein kleiner Teil APP auch in detergensunlöslichen, glycolipidangereicherten Komplexen, sogenannten DIGs (Brown & Rose, J. Cell 68 (1992), 533-544; Parton & Simons, Science 269 (1995), 1398-1399) aufgefunden. Möglicherweise wird APP durch die Bindung an GM1 an die Flöße fixiert und die Proteolyse könnte möglicherweise in den Sphingolipid-Cholesterin-Mikrodomänen stattfinden, wobei A β entsteht, das an GM1 gebunden ist. Das A β -Peptid ist im APP-Molekül genau dort lokalisiert, wo es auch zu erwarten ist, wenn man davon ausgeht, dass diese Region an ein Glycosphingolipid bindet. Eine weitere interessante Verbindung zu den Sphingolipid-Cholesterin-Flößen ist die kürzlich erhaltene Erkenntnis, dass A β an den Rezeptor für Glycanisierungsendprodukte bindet (Yan et al., Nature 382 (1996), 685-691), von denen festgestellt wurde, dass sie mit DIGs und Caveolen in Endothelzellen assoziieren (Lisanti et al., Developm. Biol. 6 (1995), 47-58).

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, dass die Verwendung cholesterinsenkender Mittel einen positiven Effekt auf die obengenannten Krankheiten ausübt. Dies beruht möglicherweise auf einer Verringerung der Zahl der Flöße in den Plasmamembranen und damit einer Verringerung der Anzahl an möglichen Ankerpunkten, an denen dann eine Konformationsänderung von Proteinen stattfindet.

30

Die erfindungsgemäße Erkenntnis, dass cholesterinsenkende Mittel sich positiv auf die Alzheimer'sche Krankheit oder Krankheiten, wie z.B. Creutzfeld-Jacob-

- 6 -

Krankheit, auswirkt, lässt erstmals eine Behandlungsmöglichkeit entstehen, die an der Ursache der Krankheit angreift.

Des Weiteren erscheint durch die erfindungsgemäße Verwendung
5 cholesterinsenkender Mittel auch allgemein eine Einflussnahme auf
Signaltransduktionsvorgänge von außen in Zellen möglich. Kürzlich konnte
gezeigt werden, dass zahlreiche Proteine, die in Sphingolipid-Cholesterin-Flößen
enthalten sind, in der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen (Parton &
Simons, Science 269 (1995), 1398-1399; Anderson, Proc. Natrl. Acad. Sci. USA
10 90 (1993), 10909-10913; Lisanti et al., Trends Cell Biol. 4 (1994), 231-235).

Durch die Entstehung von Sphingolipid-Cholesterin-Flößen wird auf der
Zellmembran eine Subkompartimentierung bewirkt, die dazu führt, dass
unterschiedliche Strukturen entstehen, also Flöße verschiedener Größe, und
15 Zwischenräume ohne Floßstruktur.

Ohne Cholesterin ist die Floßbildung nicht möglich und insofern sind also viele
Signaltransduktionsvorgänge abhängig von der Anwesenheit von Cholesterin.
Beispielhaft für solche Vorgänge können genannt werden: Signaltransduktion
20 über Heterotrimere G Proteine (Li et al., J. Biol. Chem. 270 (1995), 15693-
15701), Ras (Song et al., J. Biol. Chem. 271 (1996), 9690-9697; Mineo et al.,
J. Biol. Chem. 271 (1996), 11930-11935) und Ceramide (Liu & Anderson, J.
Biol. Chem. 270 (1995), 27179-27185). Beispiele für
Signaltransduktionsprozesse, in denen Flöße als Plattformen eine Rolle spielen,
25 sind Immunoglobulin-E-Signalprozesse in allergischen Reaktionen, T-Zell-Rezeptor-
Signalprozesse, LPS-Endotoxin-Signalprozesse, Signalprozesse der endothelischen
NO-Synthase, Signalprozesse durch Tyrosinkinasen, wie etwa Lyn und Fyn,
welche doppelt acyliert sind und über trimerische G-Proteine, die doppelt acylierte
Untereinheiten enthalten, sowie über GPI-verankerte Proteine Signale übertragen.

- 7 -

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung cholesterinsenkender Mittel zur Beeinflussung von Signaltransduktionsvorgängen an der Zellmembran.

5 Figurenbeschreibung

Fig. 1 zeigt eine Zellmembran im Querschnitt. A zeigt einen Ausschnitt mit Flößen, die mittels ihrer GPI-Anker an die exoplasmatische Schicht der Membran gebundene Proteine enthalten. B zeigt eine
10 Vergrößerung eines Sphingolipid-Cholesterin-Floßes.

Fig. 2 zeigt, dass das Entfernen von Cholesterin die Produktion und die Sekretion von $A\beta$ hemmt. a zeigt einen Immunopräzipitations-Assay von Neuronen aus dem Hippokampus, welche für 4 Tage entweder
15 in Gegenwart von (+) oder in Abwesenheit von (-) Lovastatin/Mevalonat kultiviert wurden. Cyclodextrin wurde für 0 bzw. 5 bzw. 20 Min zugegeben (0, 20, 5). b zeigt einen ähnlichen Immunopräzipitations-Assay wie a, wobei hier CD-Cholesterin für die angegebene Zeit in Min (0 bzw. 15) hinzugegeben wurde. c
20 zeigt die relative $A\beta$ -Sekretion in Zellen, in denen das Cholesterin durch Lovastatin und Cyclodextrin entfernt bzw. wieder hinzugegeben wurde, im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen (Mittel aus 3-11 Experimenten). Die Ziffern neben Cyclodextrin und CD-Cholesterin geben die Zeit der Zugabe in Minuten an.

25 Fig. 3 zeigt, dass das Entfernen von Cholesterin die Anlagerung von APP an DIGs reduziert. Neuronen wurden gemäß Beispiel 2 extrahiert und durch einen OptiPrep-Gradienten zentrifugiert, wonach größere Moleküle und Komplexe ($A\beta$ -DIG) sich mehr am oberen Ende des Teströhrchens befinden (oben) und nicht komplexierte, kleinere
30 Moleküle ($A\beta$) nach unten wandern (unten). - Depletion bzw. +

- 8 -

Depletion beziehen sich auf das Cholesterin, das, wie oben beschrieben, entfernt wurde (+) oder nicht entfernt wurde (-).

Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert, wobei die Mengenangaben und andere Einzelheiten beispielhaft und nicht erschöpfend zu verstehen sind.

Beispiele

10 Beispiel 1

Primäre Zellkulturen von Neuronen aus dem Hippokampus der Ratte wurden plattiert und nach herkömmlichen Verfahren kultiviert (minimales essentielles Medium (MEM) mit 10% Pferdeserum, 5% CO₂, 36,5°C). Die Zugabe von 5 mM Cytosinarabinose verhinderte die Vermehrung von nicht neuronalen Zellen. Nach 15 5-7 Tagen wurden 4 µM Lovastatin und 0,25 mM Mevalonat für 4 Tage hinzugegeben.

Die Neuronen wurden dann für 1 Std bei 37°C und 5% CO₂ mit rekombinantem 20 SFV infiziert, welcher für das menschliche APP 695-Protein kodiert, wie bereits aus dem Stand der Technik bekannt. Die Zellen wurden für 2 Std in Lovastatin/Mevalonat inkubiert und anschließend für 5-20 Min mit 5 mM Methyl-β-Cyclodextrin (Sigma) in einem Methionin-freien Markierungsmedium inkubiert (MEM mit 1/10 N2-Zusatz). Die Zellen wurden für 2,5 Std mit 150 µCi [³⁵S]- 25 Methionin markiert. Lovastatin hemmt bei Vorhandensein von geringen Mengen Mevalonat die Cholesterinbiosynthese. Methyl-β-Cyclodextrin entfernt speziell zelluläres Cholesterin.

Nach der metabolischen Markierung wurde das Kulturmedium gesammelt und 30 Zellextrakte hergestellt (2% NP-40, 0,2% SDS, 5 mM EDTA, mit Protease-inhibitoren als Zusatz). Die Immunopräzipitate wurden auf A-Sepharose (Boehringer) rückgewonnen und auf 10-20%-igen Tris-Tricin-Polyacrylamidgelen

- 9 -

- analysiert (Novex). Die Radioaktivität wurde anhand eines Phosphorimagers (Molecular Dynamics) bestimmt. Die verwendeten Antikörper waren Fd-APP gegen APP 695, B12/4 gegen die 20C-terminalen Aminosäuren von APP und B7/6 gegen die Aminosäuren 1-16 des synthetischen humanen A β -Peptids 1-40.
- 5 Fig.2 zeigt die Ergebnisse solcher Immunopräzipitations-Assays. In a wurden Zellen analysiert, die mit oder ohne Lovastatin kultiviert worden waren ("-" bzw. "+") sowie mit Cyclodextrin für 0 bzw. 20 bzw. 5 Min. Die sichtbaren Banden entsprechen A β . Hierdurch wird deutlich gezeigt, dass die Sekretion von A β durch das Entfernen von Cholesterin, was durch die Zugabe von Lovastatin und
- 10 Cyclodextrin bewirkt wird, reduziert werden kann. Zu einigen Zellen wurde Cholesterin wieder hinzugegeben (CD-Cholesterin).
- b zeigt einen ähnlichen Immunopräzipitations-Assay, bei dem jedoch zu den Zellen, die in den beiden rechten Bahnen dargestellt sind, Cholesterin wieder hinzugegeben wurde. Dort sind auch die A β -Banden sichtbar.
- 15 Das Diagramm c zeigt die relative A β -Sekretion unter verschiedenen experimentellen Bedingungen, die oben bereits beschrieben wurden.

Beispiel 2

- 20 Extrakte von neuronalen Zellen wurden wie in Beispiel 1 hergestellt, bis auf die Tatsache, dass sie für 20 Min pulsmarkiert wurden und dann für 100 Min in normalem Medium gechased wurden. Anschließend wurden die Zellen für 30 Min auf Eis mit 1% Triton X-100 in TEX (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 25 μ g/ml jeweils von Chymostatin, Leupeptin, Antipain,
- 25 Pepstatin A) extrahiert. Die Extrakte wurden dann mit einer äquivalenten Menge OptiPrep (Nycomed) vermischt und mit einem schrittweisen Gradienten von 30%, 25% und 3% OptiPrep in TEX überlagert. Danach wurden die Proben 3 Std bei 4°C und 50,000 U/Min zentrifugiert, die Fraktionen wurden gesammelt und immunopräzipitiert. Das Ergebnis ist in Fig.3 dargestellt. Unter "- Depletion" sind
- 30 Kontrollzellen dargestellt, in denen Cholesterin nicht entfernt wurde, während die Zellen von " + Depletion" mit Lovastatin/Cyclodextrin behandelt worden waren, um Cholesterin-Depletion zu erzielen. "oben" bezeichnet den oberen Teil des

- 10 -

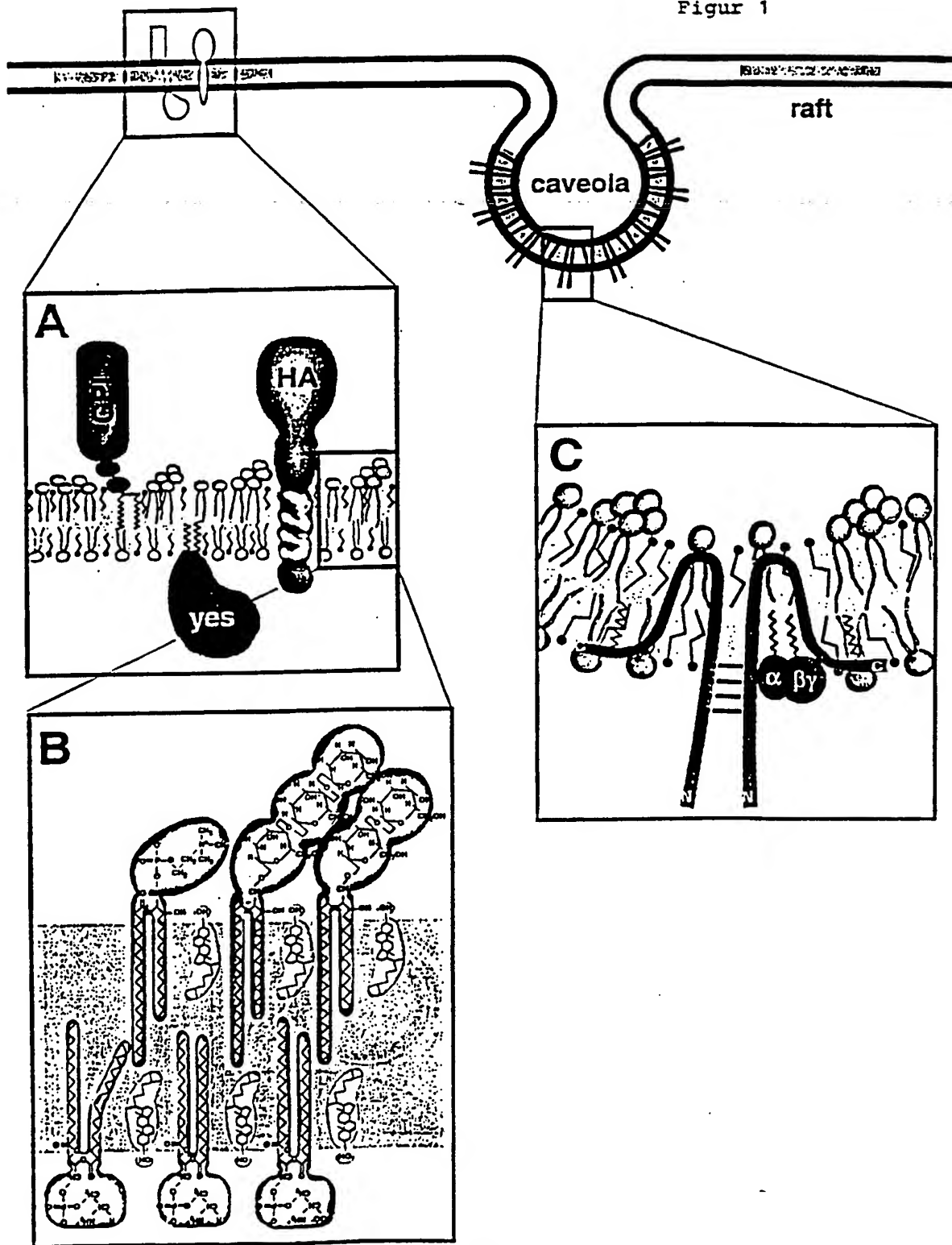
Teströhrchens, "unten" bezeichnet den unteren Teil des Teströhrchens. Bei dieser Art von Gradient wandern Komplexe und größere Moleküle, wie etwa A β -DIG nicht bis zum Boden des Röhrchens, finden sich also mehr in den Bahnen, die mit "oben" überschrieben sind, während die nicht mit DIGs assoziierten A β -Moleküle
5 nach unten wandern. Dieses Experiment zeigt also deutlich, dass in Zellen, die mit cholesterindepletierenden Mitteln behandelt worden waren, eine A β -DIG-Assoziierung reduziert wird.

- 11 -

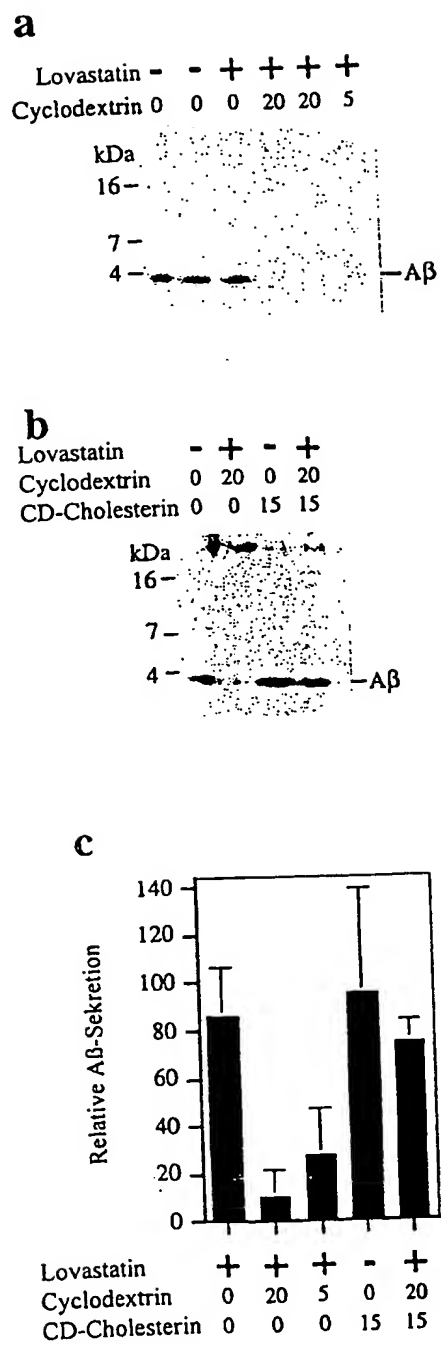
Ansprüche

1. Verwendung von cholesterinsenkenden Mitteln zur Prophylaxe oder
5 Behandlung von Erkrankungen, die auf einer Konformationsänderung von
Prionen beruhen, und von Alzheimer'scher Krankheit.
2. Verwendung von cholesterinsenkenden Mitteln zur Beeinflussung von
Signaltransduktionsvorgängen an der Zellmembran.

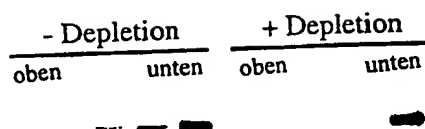
Figur 1



FIGUR 2



FIGUR 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/02284

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K31/715

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| P, X | <p>KELLER AND SIMONS: "Cholesterol is Required for Surface Transport of Influenza Virus Hemagglutinin" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 140, 23 March 1998, pages 1357-1367, XP002078575</p> <p>see page 1358, left-hand column, paragraph 2</p> <p>see page 1360, right-hand column</p> <p>see page 1364, left-hand column, paragraph 5 - right-hand column, paragraph 2; figures 7,8</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p> | 1,2 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 September 1998

Date of mailing of the international search report

07/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kanbier, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/02284

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | TARABOULOS ET AL: "Cholesterol Depletion and Modification of COOH-Terminal Sequence of the Prion Protein Inhibit Formation of the Scrapie Isoform" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 129, 1995, pages 121-132, XP002078576 see page 126 see page 129, left-hand column see page 130 see page 122 --- | 1,2 |
| X Y | WO 94 04556 A (UNIV NEW YORK) 3 March 1994 see page 1, column 14-33 see page 3, line 11-15 see page 4, line 26-30 see page 10, line 37 - page 11, line 16; claims 7-11 see page 13, line 35 - page 14, line 30; claims 13,17-19 see page 15, line 24-30 see page 19, line 15-28 --- | 2 2 |
| X Y | US 5 569 452 A (TSRL INC.) 29 October 1996 see column 1, line 50-57; claims 1,5,7 see column 3, line 37-63 --- | 2 2 |
| X | STANKEWICH ET AL: "Alterations in Cell Cholesterol Content Modulate Ca ² -Induced Tight Junction Assembly by MDCK Cells" LIPIDS, vol. 31, no. 8, 1996, pages 817-828, XP002078577 see page 819, right-hand column; figures 1A,1C see page 820; figure 5; table 4 see page 825, left-hand column see page 826, right-hand column, line 3-5 --- | 2 |
| X | CAMILLERI ET AL: "Beta-Cyclodextrin Interacts with the Alzheimer Amyloid Beta-A4 Peptide" FEBS LETTERS, vol. 341, 1994, pages 256-258, XP002078578 see page 256 see page 258, right-hand column, paragraph 2 --- -/-- | 1 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/02284

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | BANDIERA ET AL: "Inhibitors of A-Beta Peptide Aggregation as Potential Anti-Alzheimer Agents" CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 4/3, 1997, pages 159-170, XP002078579 see page 159 see page 160, right-hand column - page 161, left-hand column see page 166 ---- | 1 |
| X | WO 95 06470 A (MERCK & CO INC) 9 March 1995 see page 1, column 5-13; claims 1-4,6-10 ---- | 1 |
| X | WO 96 19987 A (JANSSEN PHARMACEUTICA NV) 4 July 1996 see page 4, column 23-30 see page 7, column 31-35 see page 8, line 37 - page 9, line 4 see page 9, line 19-24; claims 1,2,10 ---- | 1 |
| X | WO 94 02518 A (UNIV KANSAS) 3 February 1994 see page 19, paragraph 3 see page 3, paragraph 4 - page 5, paragraph 1; claims 1,30 see page 8, paragraph 4 ---- | 2 |
| X | DATABASE WPI Week 7532 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 75-53053w XP002078580 & JP 50 035315 A (NIPPON KAYAKU KK) , 4 April 1975 see abstract & JP 50 035315 A (NIPPON KAYAKU KK) 4 April 1975 ---- | 2 |
| A | WO 96 20184 A (PFIZER) 4 July 1996 see page 1, line 20-29 see page 32, line 25 - page 33, column 9 see page 34, line 13-20 ----- | 1 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/ 02284

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claim(s) 1-2 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/02284

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|--|--|
| WO 9404556 A | 03-03-1994 | AU 5081593 A CN 1087091 A | 15-03-1994 25-05-1994 |
| US 5569452 A | 29-10-1996 | NONE | |
| WO 9506470 A | 09-03-1995 | AU 7397094 A US 5368404 A | 22-03-1995 29-11-1994 |
| WO 9619987 A | 04-07-1996 | AU 4347796 A CA 2207333 A CN 1171739 A EP 0801564 A FI 972793 A NO 972980 A | 19-07-1996 04-07-1996 28-01-1998 22-10-1997 27-06-1997 26-06-1997 |
| WO 9402518 A | 03-02-1994 | US 5376645 A AU 672814 B AU 4779993 A CA 2119154 A EP 0620828 A JP 6511513 T | 27-12-1994 17-10-1996 14-02-1994 03-02-1994 26-10-1994 22-12-1994 |
| WO 9620184 A | 04-07-1996 | AU 4067795 A BG 100248 A BR 9505995 A CA 2207772 A CN 1133287 A CZ 9503447 A FI 972696 A HU 74672 A JP 10500702 T LV 11325 A LV 11325 B NO 955288 A PL 311997 A SI 9500393 A SK 158795 A US 5770594 A | 04-07-1996 31-07-1996 23-12-1997 04-07-1996 16-10-1996 11-09-1996 23-06-1997 28-01-1997 20-01-1998 20-06-1996 20-02-1997 24-06-1996 24-06-1996 30-04-1997 08-01-1997 23-06-1998 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02284

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K31/715

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| P, X | KELLER AND SIMONS: "Cholesterol is Required for Surface Transport of Influenza Virus Hemagglutinin" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, Bd. 140, 23. März 1998, Seiten 1357-1367, XP002078575 siehe Seite 1358, linke Spalte, Absatz 2 siehe Seite 1360, rechte Spalte siehe Seite 1364, linke Spalte, Absatz 5 - rechte Spalte, Absatz 2; Abbildungen 7,8 --- -/-- | 1,2 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. September 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/10/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kanbier, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02284

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | TARABOULOS ET AL: "Cholesterol Depletion and Modification of COOH-Terminal Sequence of the Prion Protein Inhibit Formation of the Scrapie Isoform" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, Bd. 129, 1995, Seiten 121-132, XP002078576 siehe Seite 126 siehe Seite 129, linke Spalte siehe Seite 130 siehe Seite 122 | 1,2 |
| X | WO 94 04556 A (UNIV NEW YORK) 3. März 1994 | 2 |
| Y | siehe Seite 1, Spalte 14-33 siehe Seite 3, Zeile 11-15 siehe Seite 4, Zeile 26-30 siehe Seite 10, Zeile 37 - Seite 11, Zeile 16; Ansprüche 7-11 siehe Seite 13, Zeile 35 - Seite 14, Zeile 30; Ansprüche 13,17-19 siehe Seite 15, Zeile 24-30 siehe Seite 19, Zeile 15-28 | 2 |
| X | US 5 569 452 A (TSRL INC.) 29. Oktober 1996 | 2 |
| Y | siehe Spalte 1, Zeile 50-57; Ansprüche 1,5,7 siehe Spalte 3, Zeile 37-63 | 2 |
| X | STANKEWICH ET AL: "Alterations in Cell Cholesterol Content Modulate Ca ² -Induced Tight Junction Assembly by MDCK Cells" LIPIDS, Bd. 31, Nr. 8, 1996, Seiten 817-828, XP002078577 siehe Seite 819, rechte Spalte; Abbildungen 1A,1C siehe Seite 820; Abbildung 5; Tabelle 4 siehe Seite 825, linke Spalte siehe Seite 826, rechte Spalte, Zeile 3-5 | 2 |
| X | CAMILLERI ET AL: "Beta-Cyclodextrin Interacts with the Alzheimer Amyloid Beta-A4 Peptide" FEBS LETTERS, Bd. 341, 1994, Seiten 256-258, XP002078578 siehe Seite 256 siehe Seite 258, rechte Spalte, Absatz 2 | 1 |
| | --- -/-- | |

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | BANDIERA ET AL: "Inhibitors of A-Beta Peptide Aggregation as Potential Anti-Alzheimer Agents" CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, Bd. 4/3, 1997, Seiten 159-170, XP002078579 siehe Seite 159 siehe Seite 160, rechte Spalte - Seite 161, linke Spalte siehe Seite 166 --- | 1 |
| X | WO 95 06470 A (MERCK & CO INC) 9. März 1995 siehe Seite 1, Spalte 5-13; Ansprüche 1-4,6-10 --- | 1 |
| X | WO 96 19987 A (JANSSEN PHARMACEUTICA NV) 4. Juli 1996 siehe Seite 4, Spalte 23-30 siehe Seite 7, Spalte 31-35 siehe Seite 8, Zeile 37 - Seite 9, Zeile 4 siehe Seite 9, Zeile 19-24; Ansprüche 1,2,10 --- | 1 |
| X | WO 94 02518 A (UNIV KANSAS) 3. Februar 1994 siehe Seite 19, Absatz 3 siehe Seite 3, Absatz 4 - Seite 5, Absatz 1; Ansprüche 1,30 siehe Seite 8, Absatz 4 --- | 2 |
| X | DATABASE WPI Week 7532 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 75-53053w XP002078580 & JP 50 035315 A (NIPPON KAYAKU KK) , 4. April 1975 siehe Zusammenfassung & JP 50 035315 A (NIPPON KAYAKU KK) 4. April 1975 --- | 2 |
| A | WO 96 20184 A (PFIZER) 4. Juli 1996 siehe Seite 1, Zeile 20-29 siehe Seite 32, Zeile 25 - Seite 33, Spalte 9 siehe Seite 34, Zeile 13-20 ----- | 1 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In...nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/ 02284

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 1-2
sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen
K rpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich
auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02284

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|--|--|
| WO 9404556 A | 03-03-1994 | AU 5081593 A CN 1087091 A | 15-03-1994 25-05-1994 |
| US 5569452 A | 29-10-1996 | KEINE | |
| WO 9506470 A | 09-03-1995 | AU 7397094 A US 5368404 A | 22-03-1995 29-11-1994 |
| WO 9619987 A | 04-07-1996 | AU 4347796 A CA 2207333 A CN 1171739 A EP 0801564 A FI 972793 A NO 972980 A | 19-07-1996 04-07-1996 28-01-1998 22-10-1997 27-06-1997 26-06-1997 |
| WO 9402518 A | 03-02-1994 | US 5376645 A AU 672814 B AU 4779993 A CA 2119154 A EP 0620828 A JP 6511513 T | 27-12-1994 17-10-1996 14-02-1994 03-02-1994 26-10-1994 22-12-1994 |
| WO 9620184 A | 04-07-1996 | AU 4067795 A BG 100248 A BR 9505995 A CA 2207772 A CN 1133287 A CZ 9503447 A FI 972696 A HU 74672 A JP 10500702 T LV 11325 A LV 11325 B NO 955288 A PL 311997 A SI 9500393 A SK 158795 A US 5770594 A | 04-07-1996 31-07-1996 23-12-1997 04-07-1996 16-10-1996 11-09-1996 23-06-1997 28-01-1997 20-01-1998 20-06-1996 20-02-1997 24-06-1996 24-06-1996 30-04-1997 08-01-1997 23-06-1998 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.